

**BADANIA FTIR-ATR I FLUORESCENCYJNE  
UKŁADÓW BIAŁKOWO-LIPIDOWYCH**

**FTIR-ATR AND FLUORESCENCE STUDIES  
OF PROTEIN-LIPID SYSTEMS**

**Adriana Litwińczuk-Mammadova,  
Katarzyna Cieślik-Boczula\*, Maria Rospenk**

*Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii  
ul. F. Joliot-Curie 14,50-383 Wrocław  
\*e-mail: katarzyna.cieslik@chem.uni.wroc.pl*

---

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Spektroskopia FTIR-ATR

1.1. Drgania fosfolipidów

1.2. Widmo FTIR-ATR białek

2. Spektroskopia fluorescencyjna

2.1. Wewnętrzna fluorescencja białek

2.2. Efekt czerwonego przesunięcia fali wzbudzenia

2.3. Sondy fluorescencyjne jako markery błon lipidowych

2.4. Anizotropia fluorescencji

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**Dr Adriana Litwińczuk-Mammadova** ukończyła studia magisterskie w 2010 roku na kierunku Informatyka Chemiczna na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskała w roku 2016 po publicznej obronie rozprawy doktorskiej pt. „Chemometrycznie wspomagana analiza oddziaływania  $\alpha$ -laktoalbuminy z modelową błoną lipidową”. Jej zainteresowania naukowe obejmują oddziaływania w układzie białkowo-lipidowym, przejścia fazowe dwuwarstw lipidowych, pośrednie stany konformacyjne białek i aplikacje metod chemometrycznych do analizy danych spektralnych.

**Dr Katarzyna Cieślik-Boczula** w roku 2002 ukończyła studia na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Praca magisterska dotyczyła fizykochemicznych badań cieni erytrocytów modyfikowanych związkami chemicznymi o aktywności biologicznej. Pracę doktorską pt. „Właściwości fotofizyczne i funkcje biologiczne pochodnych fenoli.” obroniła z wyróżnieniem w 2007 roku pod kierunkiem prof. dr hab. Aleksandra Kolla na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Aktualnie realizowane kierunki prac badawczych dotyczą badań struktury i właściwości fizykochemicznych błon lipidowych i układów białkowych metodami FTIR, FTIR-ATR, VCD, TEM, DSC i spektroskopii fluorescencyjnej. Jej zainteresowania obejmują procesy fibrylogenezy i sposobów jej modyfikacji oraz błonowo-zależne mechanizmy chemoprewencyjnej aktywności związków z rodziny fenotiazyn.

**Prof. dr hab. Maria Rospenk** absolwentka chemii Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego (1969). Stopień naukowy doktora nauk chemicznych uzyskała na Uniwersytecie Wrocławskim w 1977 roku na podstawie rozprawy „Badania wiązania wodorowego w kompleksach zasad tlenowych z HCl i HBr oraz ich deuterowanymi analogami” wykonanej pod kierunkiem prof. Lucjana Sobczyka. Habilitowała się w zakresie chemii fizycznej i teoretycznej w 1992 r., tytuł rozprawy „Równowaga przeniesienia protonu w wewnątrzcząsteczkowym wiązaniu wodorowym w zasadach Mannicha”. W 2004 r. otrzymała tytuł naukowy Profesora, nadany przez Prezydenta RP. Jej zainteresowania naukowe obejmują badania nad stanem wewnątrz- i międzycząsteczkowego wiązania wodorowego oraz jego wpływu na właściwości fizykochemiczne różnorodnych układów.

### ABSTRACT

Lipid-protein systems play crucial roles in living systems [49]. Hence, a determination of their structure at different levels of organization is still one of the most important tasks in many research projects. A study of lipid-protein systems is based on many physicochemical techniques, such as spectroscopy of FTIR, Raman, fluorescence, NMR, EPR, as well as DLS, DSC and TEM methods. In the presented paper two of the most frequently used methods, that is FTIR and fluorescence spectroscopy, will be discussed in details. They are characterized by a relatively low cost of sample preparation, a short measuring time, and they give a huge number of structural and physicochemical information about lipid-protein systems. In the FTIR-ATR spectroscopy many of vibrational bands are commonly used as very precise vibrational indicators of structural changes in lipids and proteins (Fig. 1) [1–6]. They allow to characterize lipid and protein components separately in mixed systems. Additionally, structural changes in lipid membranes can be monitored in one FTIR-ATR experiment simultaneously in a region of hydrophilic lipid head-groups (Fig. 5) [17, 18], in a hydrophobic part composed of hydrocarbon lipid chains (see Figures 2 and 3) [7–9], and in a lipid membrane interface represented by ester lipid groups (Fig. 4) [4, 6, 11, 12]. A secondary structure of proteins and peptides in different experimental conditions can be defined in the FTIR-ATR spectroscopy on the base of amide I bands (Fig. 6 and Tabs 1, 2 and 3) [20–22]. A fluorescence spectroscopy is a complementary method to FTIR spectroscopy in a study of lipid-protein systems. It provides information about time-dependent and very fast (in a scale of femtoseconds) structural processes in both lipids [41–45] and proteins [23, 27, 48]. The folding, denaturation, and aggregation of proteins and lipid membranes accompanied by changes in an order, packing and hydration of the system under study [23, 27, 41–45, 48].

**Keywords:** FTIR-ATR spectroscopy, fluorescence spectroscopy, anisotropy, REES effect, fluorescence quenching, fluorescent probes, protein, lipid

**Słowa kluczowe:** spektroskopia FTIR-ATR, spektroskopia fluorescencyjna, anizotropia, efekt REES, wygaszanie fluorescencji, model stanów dyskretnych Trp, sondy fluorescencyjne, białko, lipid

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

$\alpha$ -LA	– $\alpha$ -laktoalbumina (ang. <i><math>\alpha</math>-lactalbumin</i> )
AF	– anizotropia fluorescencji
ATR	– technika osłabionego całkowitego odbicia (ang. <i>attenuated total reflectance</i> , ATR)
DPPC	– dipalmitoilofosfatydylocholina (ang. <i>dipalmitoilphosphatidylcholine</i> )
FFT	– szybka transformata Fouriera (ang. <i>fast Fourier transform</i> )
FTIR-ATR	– Fourierowska spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ang. <i>Fourier transform infrared attenuated total reflectance</i> )
FRET	– fluorescencyjne rezonansowe przeniesienie energii (ang. <i>fluorescence resonance energy transfer</i> ), homo FRET – efekt występujący między fluoroforami jednego rodzaju
H	– heksagonalna symetria upakowania (ang. <i>hexagonal packing</i> )
IR	– podczerwień (ang. <i>infrared</i> )
$L_{\alpha}$	– lamelarna faza ciekłokrystaliczna (ang. <i>lamellar liquid crystalline</i> )
$L_{\beta}$	– lamelarna faza żelowa (ang. <i>lamellar gel phase</i> )
$O_{\perp}$	– ortorombowa symetria upakowania (ang. <i>orthorhombic packing</i> )
REES	– efekt czerwonego przesunięcia fal wzbudzenia (ang. <i>red edge excitation shift</i> )
RF	– rezonans Fermiego
TEM	– transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. <i>transmission electron microscopy</i> ), cryo-TEM – niskotemperaturowa odmiana TEM,
T <sub>m</sub>	– temperatura głównego przejścia fazowego (ang. <i>main phase transition temperature</i> )

## WPROWADZENIE

Układy białkowo-lipidowe stanowią podstawowe składniki budulcowe każdej błony biologicznej. Dzięki dużej różnorodności w składzie chemicznym błon biologicznych, mogą one pełnić wiele zasadniczych funkcji biologicznych, np. uczestnictwo w separacji komórek i organelli wewnątrzkomórkowych, komunikacji biologicznej poprzez m.in. kontrolę nad transportem energii i enzymów między oddzielnymi obszarami komórek, oraz współdziałanie w wielu szlakach metabolicznych [49]. Ze względu na zasadniczą rolę w funkcjonowaniu żywych organizmów, systemy białkowo-lipidowe stały się przedmiotem szerokich badań, w których zaangażowano różnorodne metody fizykochemiczne, np. spektroskopię FTIR, Ramana, fluorescencyjną, NMR, EPR czy technikę DLS, DSC i transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM). W ramach niniejszej pracy zostaną szczegółowo omówione dwie z wyżej wymienionych metod pomiarowych, tj. spektroskopia FTIR oraz fluorescencyjna. Metody te ze względu na relatywnie niski koszt przygotowania próbek, krótki czas pomiarowy a z drugiej strony bogactwo uzyskanych informacji o badanym układzie są szczególnie często stosowane do badań nad układami białkowo-lipidowymi. Zaletą spektroskopii FTIR jest możliwość uzyskania na podstawie analizy otrzymanych widm szczegółowych informacji strukturalnych o badanym układzie. Występowanie szeregu pasm FTIR będących swoistymi markerami różnych zmian strukturalnych pozwala na jednoczesny opis stanów konformacyjnych, oddziaływań wewnątrz- i międzycząsteczkowych w skali nie tylko całego układu ale również w odniesieniu do poszczególnych jego części. Komplementarną metodą jest spektroskopia fluorescencyjna, która pozwala uzupełnić informacje strukturalne, otrzymane na podstawie widm FTIR, o czasowo-zależną charakterystykę bardzo szybkich procesów, tzn. zachodzących np. w skali femtosekundowych. Procesy foldingu i agregacyjne białek wynikające ze zmiany w uporządkowaniu, upakowaniu i uwodnieniu układu mogą być z powodzeniem śledzone z wykorzystaniem spektroskopii fluorescencyjnej.

### 1. SPEKTROSKOPIA FTIR-ATR

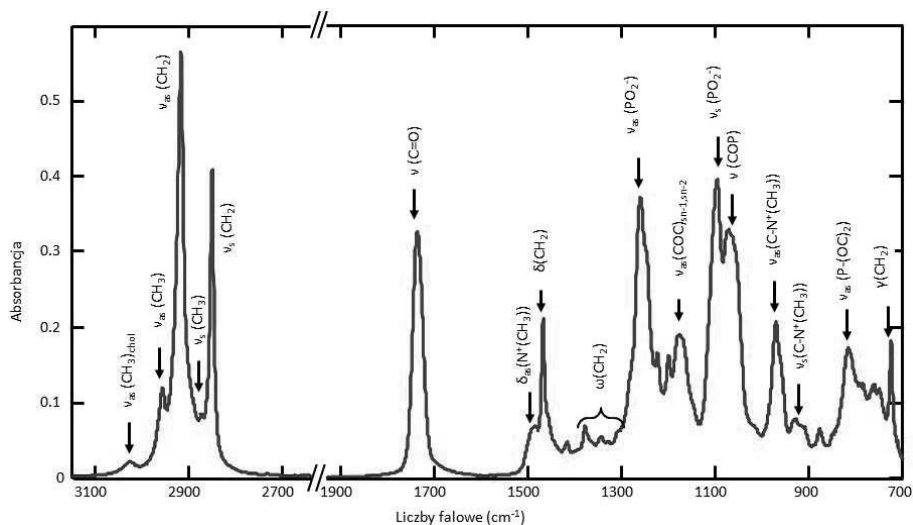
Fourierowska spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ang. *Fourier transform infrared attenuated total reflectance*, FTIR-ATR) jest jedną z powszechnie stosowanych technik do badań układów biologicznych, począwszy od peptydów zawierających jedynie kilka reszt aminokwasowych w cząsteczce po wyizolowane enzymy a nawet kompleksy peptyd-białko i białko-błona lipidowa o dużych masach cząsteczkowych. Metoda ta dostarcza informacji o strukturze i oddziaływaniach międzycząsteczkowych jak również ujawnia zmiany strukturalne wywołane zewnętrznym zaburzeniem (np. temperaturą lub pH) [1, 2]. Zastosowanie w spektroskopii FTIR procedury szybkiej transformaty Fouriera (ang. *fast Fourier transform*, FFT) umożliwia gromadzenie znacznej liczby interferogramów

i zwiększenie stosunku sygnału do szumu (S/N), co sprawia, że zarejestrowane widma odznaczają się zadawalającą rozdzielczością [1] i mogą być z powodzeniem stosowane przy badaniu układów biologicznych w środowisku wodnym.

Spektroskopia FTIR w połączeniu z techniką osłabionego całkowitego odbicia (ang. *attenuated total reflectance*, ATR) umożliwia rejestrację widm substancji nieprzezroczystych, próbek o niskim stężeniu ( $\leq 0,3$  mg/mL), zarówno w rozpuszczalniku wodnym jak i organicznym, w zawiesinie, czy też w środowisku błony lipidowej [1–6]. Należy w tym miejscu podkreślić, że metoda FTIR-ATR dostarcza informacji o wąskiej warstwie próbki stykającej się z powierzchnią kryształu [5].

### 1.1. DRGANIA FOSFOLIPIDÓW

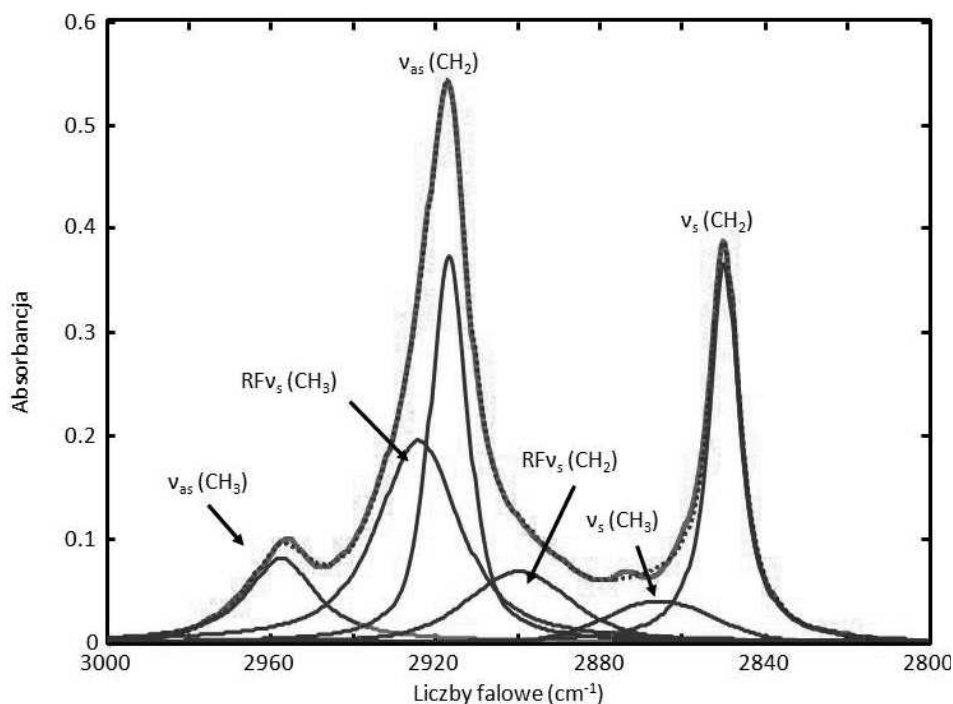
Wynikiem absorpcji światła w zakresie średniej podczerwieni przez cząsteczki fosfolipidów, np. dipalmitoilofosfatydylocholina (DPPC) jest zbiór pasm drgań normalnych w zakresie od  $4000$  do  $700$   $\text{cm}^{-1}$ . Rysunek 1 przedstawia widmo FTIR-ATR dwuwarstw DPPC w postaci suchego filmu wraz z przypisaniem pasm, których przeważająca większość stanowi powszechnie używane markery zmian strukturalnych badanych błon lipidowych.



Rysunek 1. Widmo FTIR-ATR suchego filmu DPPC o pH 8 zarejestrowane w temperaturze  $25^{\circ}\text{C}$   
 Figure 1. FTIR-ATR spectrum of the dry DPPC film at pH 8 and  $25^{\circ}\text{C}$

Drżania rozciągające apolarnych łańcuchów węglowodorowych tj. grup metylenowych i metylowych, występują w rejonie wysokoczęstotściowym od  $3100$  do  $2800$   $\text{cm}^{-1}$ . Pasma drgań rozciągających grupy metylenowej ( $\nu(\text{CH}_2)$ ), charakteryzują się najwyższą intensywnością z spośród wszystkich pasm fosfolipidu i leżą przy około  $2920$  i  $2850$   $\text{cm}^{-1}$ , odpowiednio dla drżania  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  i  $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ . Parametry spektralne

tych pasm jak położenie i kształt, silnie korelują z rodzajem fazy liotropowej i termotropowej agregatów lipidowych. Ogrzewanie dwuwarstwy powyżej temperatury głównego przejścia fazowego prowadzi do przesunięcia pasm  $\nu_{as,s}(\text{CH}_2)$  w stronę wyższych liczb falowych i do ich wyraźnego poszerzenia w wyniku wzrostu liczby konformacji *gauche* wzdłuż wiązań C-C łańcuchów alkilowych budujących cząsteczki lipidowe. Pasma drgań grup metylowych występują przy około  $2956\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{as}(\text{CH}_3)$ ) i  $2870\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_s(\text{CH}_3)$ ). Są to pasma o małej intensywności, przez co ich analiza jest utrudniona. Ponadto, rozkład pasm występujących w rejonie wysokoczęstotliwościowym (Rys. 2) pozwala na ujawnienie dwóch dodatkowych pasm, tj.  $\text{RF}\nu_s(\text{CH}_3)$  i  $\text{RF}\nu_s(\text{CH}_2)$  leżących odpowiednio przy  $2934$  i  $2900\text{ cm}^{-1}$  i będących wynikiem rezonansu Fermiego (RF) pomiędzy pierwszym nadtonem drgania  $\delta_s(\text{CH}_2)$  i drgań  $\nu_s(\text{CH}_3)$  oraz  $\nu_s(\text{CH}_2)$  [7]. Położenie pasm  $\text{RF}\nu_s(\text{CH}_3)$  i  $\text{RF}\nu_s(\text{CH}_2)$  silnie zależy od natury dwuwarstw lipidowych, tj. składu chemicznego, stopnia uwodnienia i fazy termotropowej błony lipidowej [8].



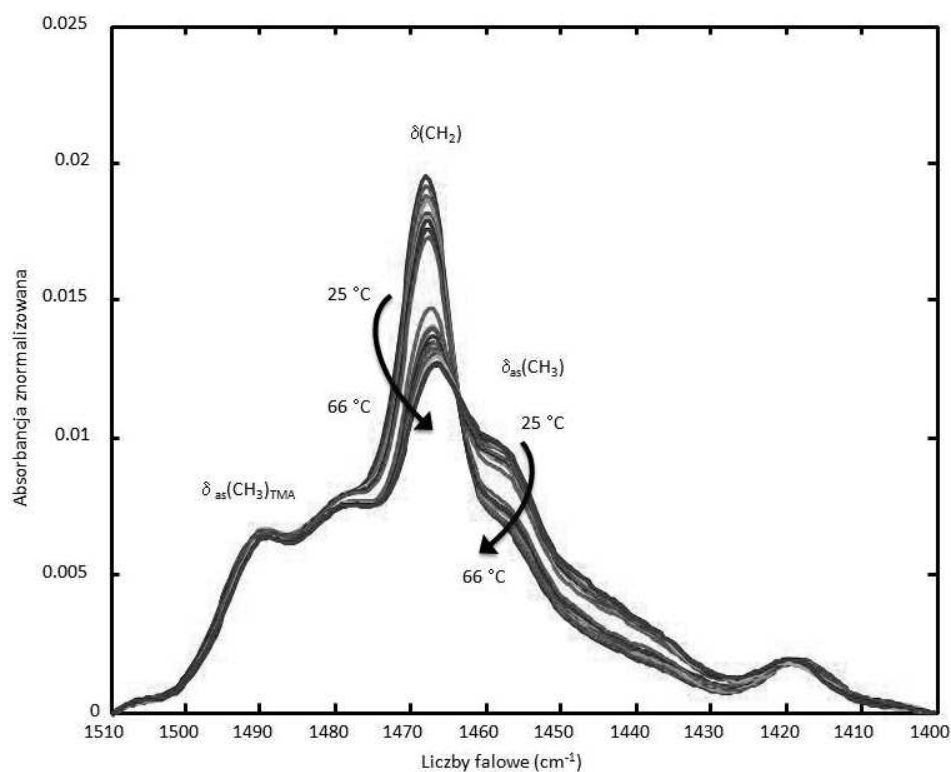
Rysunek 2. Dekonwolucja pasm występujących w zakresie  $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$  dla dwuwarstw DPPC o pH 8 w postaci suchego filmu

Figure 2. Deconvolution of bands in the range of  $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$  for the DPPC dry film at pH 8

Drgania deformacyjne grup  $\text{CH}_2$  i  $\text{CH}_3$  dają pasma leżące w obszarze  $1500\text{--}1190\text{ cm}^{-1}$ . Z pośród drgań zginających grupy  $\text{CH}_2$  należy wyróżnić drgania: nożycowe ( $\delta(\text{CH}_2)$ ), wachlarzowe ( $\omega(\text{CH}_2)$ ) oraz kołyszące ( $\gamma(\text{CH}_2)$ ). Pasma pochodzące od  $\delta(\text{CH}_2)$  i  $\gamma(\text{CH}_2)$  dominują odpowiednio w zakresach  $1480\text{--}1465\text{ cm}^{-1}$

i 720–730  $\text{cm}^{-1}$ . Ich położenie i liczba odzwierciedlają siłę oddziaływań międzyłańcuchowych i dostarczają informacji o upakowaniu łańcuchów węglowodorowych w hydrofobowej części błon lipidowych. Rysunek 3 przedstawia widma IR w zakresie pasma drgań  $\delta(\text{CH}_2)$  zawiesiny liposomów DPPC zarejestrowane w funkcji temperatury. W miarę wzrostu temperatury układu, pasmo drgań  $\delta(\text{CH}_2)$  przesuwa się w stronę niższych liczb falowych w wyniku zmiany symetrii upakowania błony DPPC z heksagonalnej do zaburzonej heksagonalnej. Natomiast, wzrost temperatury powoduje przesunięcie pasma drgań  $\gamma(\text{CH}_2)$  w stronę przeciwną tj. w kierunku wyższych liczb falowych [8, 9].

Seria pasm drgań  $\omega(\text{CH}_2)$  występuje w przedziale liczb falowych od 1370 do 1190  $\text{cm}^{-1}$  [8, 9]. Ich liczba koreluje z konformacją i ilością grup  $\text{CH}_2$  budujących łańcuchy węglowodorowe cząsteczek lipidowych. Dla fosfatydylocholin z uporządkowanymi łańcuchami mirystynowymi w konformacji *all-trans* pierwsze z sześciu pasm progresji pojawia się przy 1325  $\text{cm}^{-1}$  a ostatnie przy 1204  $\text{cm}^{-1}$ . Należy podkreślić, że pasma te silnie pokrywają się z pasmem drgań  $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$  [8].



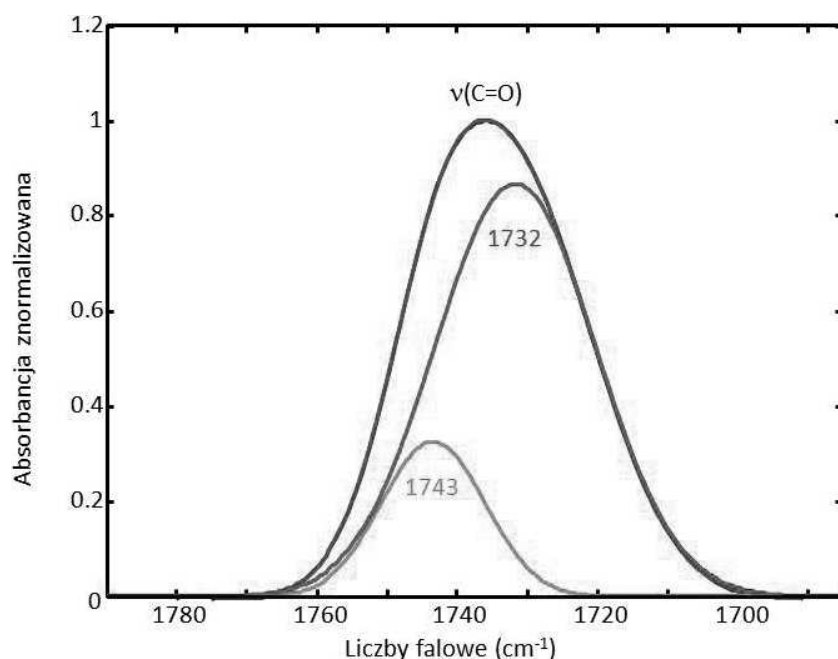
Rysunek 3. Widma FTIR-ATR w zakresie pasma drgań  $\delta(\text{CH}_2)$  uwodnionego filmu DPPC o pH 8 zarejestrowane w funkcji temperatury od 25 do 66°C

Figure 3. FTIR-ATR spectra in  $\delta(\text{CH}_2)$  band range of the hydrated DPPC film at pH 8 collected from 25 to 66°C



W przypadku wysokotemperaturowych faz termotropowych błon lipidowych, drgania wachlarzowe grup  $\text{CH}_2$  dają także pasma leżące powyżej  $1330\text{ cm}^{-1}$ . Ich położenie odzwierciedla miejsce występowania konformacji typu *gauche* w łańcuchu węglowodorowym. Konformacja *gauche* znajdująca się przy terminalnej grupie  $\text{CH}_3$  (ang. *end gauche*) daje pasmo przy około  $1340\text{ cm}^{-1}$ . Z kolei, pasmo sekwencji *gauche-gauche* (ang. *double gauche*) znajduje się około  $1350\text{ cm}^{-1}$ . W przypadku, gdy dwie formy *gauche* oddziela konformacja *trans* (*gauche-trans-gauche*, *gtg*) powstaje zgięcie (ang. *kink*) łańcucha alkilowego, któremu odpowiada pasmo przy  $\sim 1370\text{ cm}^{-1}$  [8]. Pasma położone przy  $\sim 1378\text{ cm}^{-1}$  jest rezultatem symetrycznego drgania deformacyjnego ( $\delta_s(\text{CH}_3)$ , ang. *methyl umbrella*) końcowych grupy  $\text{CH}_3$  łańcucha alifatycznego, zaś, pasmo pochodzące od jego asymetrycznego odpowiednika ( $\delta_{as}(\text{CH}_3)$ ) jest położone przy około  $1460\text{ cm}^{-1}$ . Ponieważ, absorbancja drgania  $\delta_s(\text{CH}_3)$  jest niewrażliwa na konformację łańcucha, jego pasmo jest często stosowane jako standard wewnętrzny do normalizacji intensywności sąsiednich pasm drgania  $\omega(\text{CH}_2)$  [8].

Pasma pojawiające się na widmie fosfatydylocholin w zakresie  $1750\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$  pochodzą od drgań rozciągających grupy estrowej. Położenie i liczba składowych tego pasma silnie zależą od sąsiedztwa grup polarnych i liczby utworzonych wiązań wodorowych. W przypadku dwuwarstwy w postaci suchego filmu, rozkład pasma  $\nu(\text{C=O})$  odsłania dwie składowe z maksimum przy  $1742$  i  $1725\text{ cm}^{-1}$ . Pierwsza składowa odpowiada drganiu grupy  $\text{C=O}$  łańcucha tłuszczowego w konformacji *sn-1* znajdującej się bliżej hydrofobowych obszarów zajmowanych przez łańcuchy węglowodorowe. Natomiast, drugie pasmo składowe odpowiada grupie  $\text{C=O}$  łańcucha tłuszczowego w konformacji *sn-2* ulokowanej w sąsiedztwie fragmentu fosforanowego części polarnej dwuwarstwy [4, 6, 11, 12]. Pomimo wielu badań dotyczących pasma drgań  $\nu(\text{C=O})$  uwodnionej dwuwarstwy lipidowej, jego analiza jest wciąż tematem otwartym. Blume i współpracownicy [13] oraz Lewis i współpracownicy [14], którzy zastosowali izotopowe podstawienie  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  do badań nad konturem pasma grupy  $\text{C=O}$  dla uwodnionych dwuwarstw DPPC, zróznicowali składowe pasma  $\nu(\text{C=O})$  ze względu na liczbę utworzonych wiązań wodorowych z polarnymi cząsteczkami. Subpasmo przy wyższych liczbach falowych (Rys. 4A) odpowiada drganiu grupy  $\text{C=O}$  cechującej się słabszymi i lub mniej licznymi kontaktami z cząsteczkami wody. Natomiast subpasmo przesunięte w stronę niższych liczb falowych pochodzi od drgań grupy  $\text{C=O}$  zaangażowanej w większą liczbę wiązań wodorowych z polarnymi cząsteczkami wody. Przejście z fazy żelowej do fazy ciekłokrystalicznej błony lipidowej wiąże się ze zmniejszeniem populacji pasma przy wyższych liczbach falowych na rzecz pasma przy niższych liczbach falowych, co skutkuje przesunięciem całej obwiedni pasma eksperymentalnego w stronę dalekiej podczerwieni.



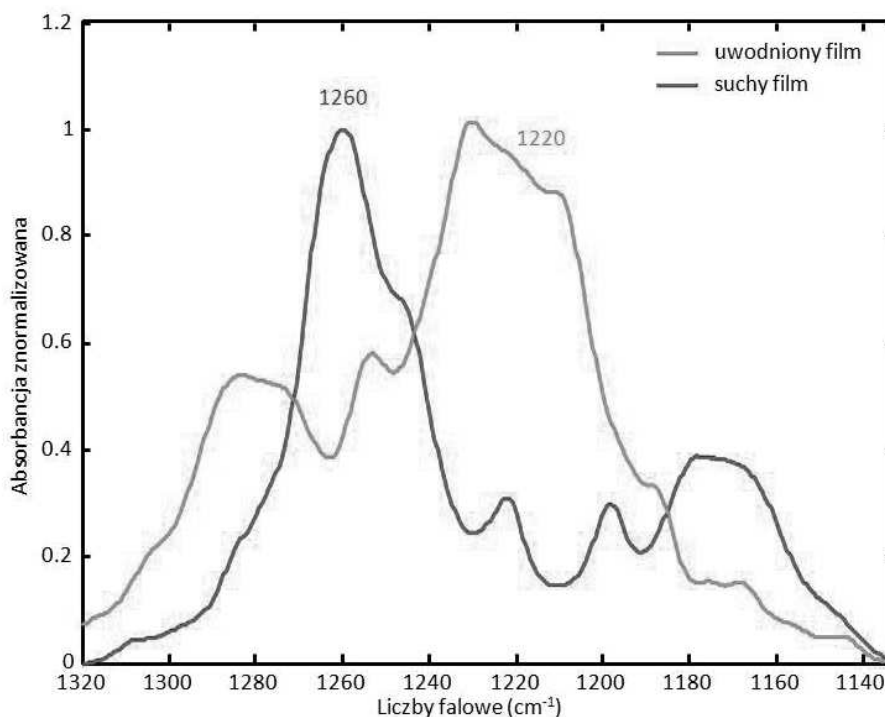
Rysunek 4. Widmo FTIR-ATR w zakresie pasma drgań  $\nu(\text{C}=\text{O})$  uwodnionych filmów DPPC o pH 8 w fazie żelowej

Figure 4. FTIR-ATR spectra in the range of  $\nu(\text{C}=\text{O})$  band of the hydrated DPPC film at pH 8 in a gel phase

Pasma drgań  $\nu(\text{COC})$  antysymetryczne i symetryczne występują odpowiednio przy 1180 i 1075  $\text{cm}^{-1}$  [15]. Pasma drgań  $\nu_{\text{as}}(\text{COC})$  często ulega rozszczepieniu na dwie składowe z maksimum przy 1190 i 1170  $\text{cm}^{-1}$  pochodzące od absorpcji grup C-O-O w poszczególnych łańcuchach *sn-1* i *sn-2* [7, 15]. Binder i współpracownicy [16] sugerują, że zmiany w obrębie tych pasm są związane ze wzrostem uwodnienia.

Najbardziej rozpoznawalnymi pasmami drgań części polarnej fosfolipidowych błon lipidowych są pasma pochodzące od grupy fosforanowej. Asymetryczne i symetryczne drgania grupy  $\text{PO}_2^-$  dają pasma odpowiednio w zakresach: 1255–1225  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ ) i 1095–1085  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$ ) [15]. Podobnie jak w przypadku pasma drgań  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , również pasmo drgań  $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$  wykazuje dużą wrażliwość na zmianę polarności otoczenia i możliwość oddziaływania poprzez wiązanie wodorowe. Podczas uwadniania dwuwarstwy lipidowej maksimum pasma drgania  $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$  przesuwają się w stronę niższych liczb falowych co jest następstwem zwiększania populacji lipidowych grup fosforanowych oddziałujących z cząsteczkami wody. Rysunek 5 pokazuje zależność między stopniem uwodnienia dwuwarstw DPPC a położeniem pasma  $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ . Ponadto, Lee i Chapman [17] wykazali, że w przypadku uwodnionych dwuwarstw DPPC położenie pasma drgań  $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$  nie ulega zmianie w trakcie głównego przejścia fazowego. Jest to spowodowane wysyceniem wiązań wodorowych przez grupę fosforanową już w fazie żelowej błony, gdzie mamy już do czynienia z utworzeniem pełnej powłoki hydratacyjnej. W konsekwencji dal-

szeregowanie błony lipidowej podczas przejścia do fazy ciekłokrystalicznej nie wpływa na właściwości spektralne drgań grupy  $\text{PO}_2^-$ . Natomiast, położenie pasma pochodzącego od drgania  $\nu_s(\text{PO}_2^-)$  przede wszystkim odzwierciedla zmiany konformacji fragmentu fosforanowego [18].



Rysunek 5. Widma FTIR-ATR w regionie asymetrycznych drgań grupy  $\text{PO}_2^-$  dla dwuwarstw DPPC o pH 8 w postaci suchego (kolor niebieski) i uwodnionego filmu (kolor czerwony)

Figure 5. FTIR-ATR spectra of asymmetric vibrations of  $\text{PO}_2^-$  groups of DPPC bilayers at pH 8, in dry (blue color) and hydrated film (red color)

Ponadto, fragment C-O-P-O-C części fosforanowej cząsteczki lipidu daje pasma przy około 1145, 1120, 1055 i 985  $\text{cm}^{-1}$ . Dwa pierwsze pochodzą od drgania rozciągającego wiązania pomiędzy atomem tlenu i węgla połączonego w pierwszym przypadku z częścią cholinową ( $\text{C}^{\text{C}}$ ), a w drugim z fragmentem glicerynowym ( $\text{C}^{\text{G}}$ ). Dwa kolejne pasma należą do drgania wiązania P-O od strony grupy cholinowej ( $\nu(\text{P-O}(\text{C}^{\text{C}}))$ ) i glicerynowej ( $\nu(\text{P-O}(\text{C}^{\text{G}}))$ ) [15].

Pasma drgań grupy cholinowej tworzącej najbardziej zewnętrzną część błony, występują w trzech rejonach widma FTIR. W zakresie od 3050 do 3000  $\text{cm}^{-1}$  pojawia się mało intensywne pasmo pochodzące od drgań  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)_{\text{chol}}$ . Podczas uwodnienia suchego filmu, pasmo to przesuwa się w kierunku dłuższych fal na skutek osłabienia oddziaływania między cholinową grupą metylową i grupą fosforanową [12]. Pasma drgań  $\delta_{\text{as}}(\text{N}^+(\text{CH}_3))$  i  $\delta_s(\text{N}^+(\text{CH}_3))$  występują w sąsiedztwie pasma drgań  $\delta(\text{CH}_2)$ ,

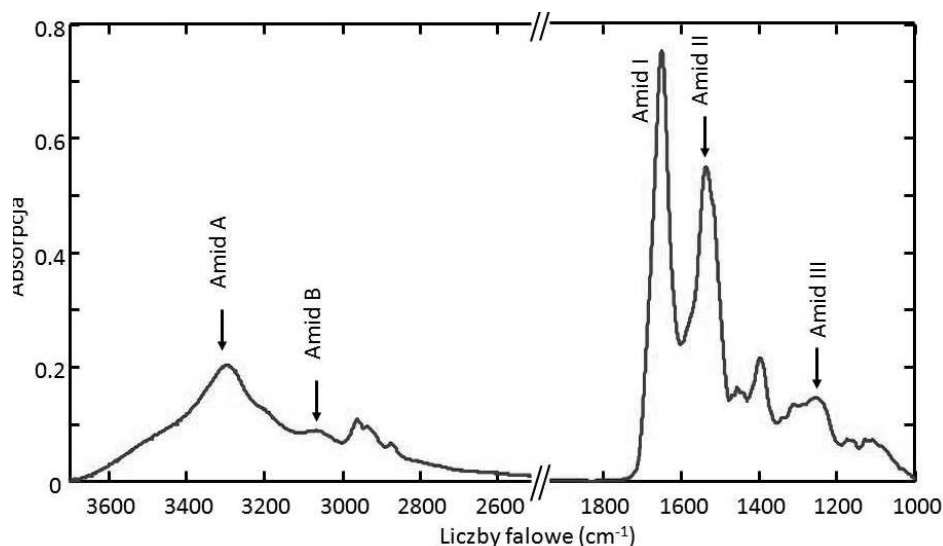
odpowiednio przy  $1485\text{ cm}^{-1}$  i  $1405\text{ cm}^{-1}$ . Natomiast, pasma drgań  $\nu_{\text{as}}(\text{C-N}^+(\text{CH}_3))$  i  $\nu_{\text{s}}(\text{C-N}^+(\text{CH}_3))$  występują przy  $970\text{ cm}^{-1}$  i  $920\text{ cm}^{-1}$  [15].

## 1.2. WIDMO FTIR-ATR BIAŁEK

Jedną z najczęściej stosowanych metod w badaniach nad strukturą i dynamiką białek jest spektroskopia w podczerwieni, która pozwala na rejestracje widm białek nie tylko w mętnych zawiesinach, ale również w środowisku dwuwarstwy lipidowej. Wymienione zalety czynią technikę FTIR szczególnie przydatną w poznawaniu mechanizmów procesów zachodzących na poziomie błon biologicznych, stanowiących układy białkowo-lipidowe [4].

Naświetlenie próbki białka promieniowaniem z zakresu średniej podczerwieni, wzbudza drgania grup amidowych łańcucha polipeptydowego oraz reszt aminokwasowych, których charakterystyczne częstości dla licznych grup białek i peptydów są opisane w literaturze [19, 20].

Drgania grup szkieletu polipeptydowego są powszechnie charakteryzowane na podstawie drgań wzorca, tj. *N*-metyloacetamidu, najmniejszej cząsteczki posiadającej grupę amidową w konformacji *trans*. Jeśli przyjmiemy za masy punktowe grupy metylowe, wówczas otrzymamy 6-atomowy układ, który powinien wykonywać 12 drgań normalnych (9 drgań amidowych i 3 drgania szkieletowe) [19]. Rysunek 6 przedstawia 5 najważniejszych pasm amidowych na przykładzie widma FTIR ATR zarejestrowanego dla suchego filmu  $\alpha$ -laktoalbuminy.



Rysunek 6. Widmo FTIR-ATR dla suchego filmu  $\alpha$  laktoalbuminy przy pH 8 w temperaturze  $25^\circ\text{C}$   
Figure 6. FTIR-ATR spectrum in of  $\alpha$  laktalbumin dry film at pH 8 and  $25^\circ\text{C}$

Tabela 1. Charakterystyka pasm amidowych występujących na widmie przedstawionym na Rysunku 6  
 Table 1. Characteristics of the amide bands present in the spectrum shown in Figure 6

Przybliżone położenie ( $\text{cm}^{-1}$ )	Symbol pasma amidowego	Przypisanie [2, 19]
~3300	A	$\nu(\text{NH})$ w rezonansie Fermiego z I nadtonem drgania Amid II
~3100	B	
1610–1695	I	$\nu(\text{C}=\text{O})$
1480–1575	II	$\delta(\text{NH})$ & $\nu(\text{CN})$
1220–1320	III	$\nu(\text{CN})$ & $\delta(\text{NH})$

Pasma Amid A i B (Tab. 1) są najbardziej przesuniętymi pasmami w stronę bliskiej podczerwieni. Pochodzą od drgania rozciągającego grupy NH sprzężonego rezonansem Fermiego z pierwszym nadtonem drgania Amid II. Położenie pasma Amid A zależy od siły oddziaływania wodorowego grupy NH i leży w przedziale od 3310 do 3270  $\text{cm}^{-1}$ . Z kolei, pasmo Amid B położone jest w zakresie 3100–3030  $\text{cm}^{-1}$ , jednak z powodu niskiej intensywności jest zwykle pomijane w analizach [19].

W zakresie liczb falowych 1610–1695  $\text{cm}^{-1}$ , występuje pasmo Amid I z dominującym wkładem od drgania  $\nu(\text{C}=\text{O})$ . Pozostałe znacznie mniejsze wkłady pochodzą od drgań:  $\nu(\text{CN})$ ,  $\delta(\text{CCN})$  i  $\delta(\text{NH})$  w płaszczyźnie wiązań. Analiza pasma Amid I odgrywa kluczową rolę w określeniu rodzaju struktury drugorzędowej białka (Tab. 2). W obrębie pasma Amid I występuje szereg pasm składowych, które można wyodrębnić stosując dekonwojucję Fouriera lub metodę fitowania [19]. Ich położenie niemal wyłącznie zależy od siły wiązania wodorowego spinającego poszczególne elementy struktury drugorzędowej (Tab. 2) Podczas określania wkładu struktury  $\beta$ -kartki do struktury białka, należy uwzględnić również fakt, że drganie  $\nu(\text{C}=\text{O})$  cechuje wysoki molowy współczynnik absorpcji, który podwyższa jego aktywność spektralną [19].

Tabela 2. Położenie składowych pasma Amid I odzwierciedlające rodzaj struktury drugorzędowej białka [2]. 1Wartości molowego współczynnika absorpcji wyznaczono względem wewnętrznego standardu TSPA [21].

Table 2. The position of amide component band and correlated types of protein secondary structure [2] 1Values molar absorption coefficient was determined relative to the internal standard TSPA [21]

Przybliżone położenie ( $\text{cm}^{-1}$ )	Rodzaj struktury drugorzędowej	Molowe współczynniki absorpcji <sup>1</sup> [21]
1675–1695	antyrownoległa $\beta$ -kartka (składowa wysokoczęstotliwościowa)	
1660–1685	$\beta$ -zgięcie	1,42 $\pm$ 0,83
1660–1670	$3_{10}$ helisa	
1648–1660	$\alpha$ -helisa	2,96 $\pm$ 0,20
1652–1660	struktury nieregularne	1,61 $\pm$ 0,07
1625–1640	antyrownoległa $\beta$ -kartka (składowa niskoczęstotliwościowa)	4,27 $\pm$ 0,28

Przybliżone położenie (cm <sup>-1</sup> )	Rodzaj struktury drugorzędowej	Molowe współczynniki absorpcji <sup>1</sup> [21]
1610–1628	forma zagregowana $\beta$ -struktury	

Pasma Amid II wykazuje także wrażliwość na zmiany w strukturze drugorzędowej badanych białek, choć nie jest ono w interpretacji tak jednoznaczne jak Amid I, głównie z powodu wpływu drgań łańcuchów bocznych. Pasma Amid II pochodzi głównie od drgania  $\delta(\text{NH})$  w płaszczyźnie wiązania i drgania  $\nu(\text{CN})$ , natomiast w mniejszym stopniu od drgań  $\delta(\text{C-O})$  oraz  $\nu(\text{CC})$  i  $\nu(\text{NC})$ . W zakresie liczb falowych od 1400 do 1200 cm<sup>-1</sup> występuje pasmo Amid III, które jest wynikiem sprzężenia drgań  $\delta(\text{NH})$  i  $\nu(\text{CN})$  z niewielkim wkładem od drgań  $\delta(\text{C-O})$  oraz  $\nu(\text{C-C})$ . Pasma to wykazuje mniejsze powinowactwo do konformacji łańcucha polipeptydowego z powodu znacznego wpływu drgań szkieletu C-C i drgań reszt aminokwasowych. Trzy pasma drgania  $\nu(\text{C-C})$  szkieletu leżą w zakresie 1200–880 cm<sup>-1</sup> [19].

Pomimo, że pasma Amid II i III wykazują mniejszą specyficzność względem przestrzennej konformacji łańcucha polipeptydowego, są również stosowane do określenia typu struktury drugorzędowej (Tab. 3). W przypadku badań prowadzonych metodą spektroskopii w podczerwieni, analizie poddaje się głównie pasma Amid I i II. Natomiast, podczas badań spektroskopią Ramana analizowane są pasma Amid I i III.

Tabela 3. Położenie składowych pasm Amid II i III odzwierciedlające rodzaj struktury drugorzędowej białka [22]

Table 3. The position of subcomponents of Amide II and III bands reflects a type of the protein secondary structure [22]

Rodzaj struktury drugorzędowej	Pasma amidowe	Przybliżone położenie (cm <sup>-1</sup> )
$\alpha$ -helisa	II	1545
	III	1293, 1300–1311, 1316–1320, 1331
$\beta$ -kartka	II	1530
	III	1223–1225, 1231–1238, 1242, 1248–1251
$\beta$ -zgięcie	II	1528, 1577
struktury nieregularne	III	1244, 1259–1269, 1280–1290

Analiza widm FTIR wodnych roztworów białka może stwarzać duże problemy z powodu silnego nakładania się pasm pochodzących od drgań rozpuszczalnika z pasmami amidowymi. W zakresie charakterystycznym dla pasm Amid A i B występują pasma drgań  $\nu_{\text{as,s}}(\text{OH})$  wody. Z kolei, pasmo Amid I jest zasłanianie przez silne pasmo drgania  $\delta(\text{OH})$  wody. W celu uzyskania widma czystego białka należy zastosować procedurę odjęcia widma zarejestrowanego dla samego rozpuszczalnika [1, 2, 5].

Dodatkowo badanie struktury drugorzędowej na podstawie pasm amidowych jest utrudnione z powodu występowania w ich zakresach pasm drgań łańcuchów bocznych. Oszacowano, że 10–30% całkowitej absorpcji występującej w zakresie liczb falowych od 1610–1700  $\text{cm}^{-1}$  pochodzi od drgań łańcuchów bocznych. Są to przede wszystkim pasma drgań  $\nu(\text{C}=\text{O})$  grupy Gln i Asn oraz  $\nu_{\text{as,s}}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$  grupy Arg [20]. Jednak, analiza pasm reszt aminokwasowych, może także dostarczyć ważnych informacji o mechanizmach reakcji, w której badane białko jest zaangażowane. Zakresy charakterystyczne dla reszt aminokwasowych białek zostały szczegółowo omówione w literaturze [20].

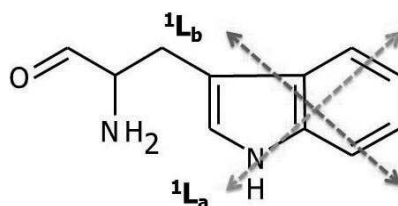
## 2. SPEKTROSKOPIA FLUORESCENCYJNA

Badania nad strukturą i dynamiką układów białkowo-lipidowych można także przeprowadzić stosując metodę spektroskopii fluorescencyjnej, która dostarcza informacji o lokalnym otoczeniu fluoroforów. Fluorofory to cząsteczki lub grupy atomów, które po wzbudzeniu fluoryzują, czyli emitują promieniowanie z najniższego oscylacyjnego poziomu pierwszego elektronowego stanu wzbudzonego. Fluorofory można podzielić na dwie grupy. Pierwsza z nich obejmuje tzw. fluorofory wewnętrzne, czyli takie, które występują naturalnie w badanej cząsteczce, np.: aromatyczne reszty aminokwasowe białek. Natomiast, drugą grupę stanowią fluorofory zewnętrzne, które są stosowane w badaniach próbek niefluoryzujących takich jak błony lipidowe [23].

### 2.1. WEWNĘTRZNA FLUORESCENCJA BIAŁEK

Peptydy i białka wykazują wewnętrzną (inherentną) fluorescencję, która pochodzi od trzech aromatycznych reszt aminokwasowych: tryptofanu, tyrozyny i fenyloalaniny. Dominujący wkład w emisję białka pochodzi od tryptofanu, którego współczynnik absorpcji ma największą wartość z pośród wymienionych wyżej aminokwasów. Dodatkowo, energia zaabsorbowana przez tyrozinę i fenyloalaninę jest często przenoszona do tryptofanu. Aminokwas ten charakteryzuje się także najdłuższą linią wzbudzenia, co pozwala na jego selektywne wzbudzenie długością fali równą lub większą od 295 nm [23, 24].

Absorpcji promieniowania z zakresu 260–300 nm towarzyszą elektronowe przejścia absorpcyjne pomiędzy orbitalami  $\pi \rightarrow \pi^*$  w obrębie pierścienia indolowego tryptofanu oznaczane symbolami  $^1L_a$  i  $^1L_b$  [23, 25, 26] zgodnie z nomenklaturą zaproponowaną przez Platt'a [27]. Ich wektory są zorientowane prostopadle względem siebie jak przedstawia Rysunek 7.



Rysunek 7. Struktura tryptofanu wraz z elektronowym przejściem absorpcyjnym pierścienia indolowego  
 Figure 7. The structure of tryptophan with electron transition absorption of the indole ring

Widmo emisji tryptofanu jest bardzo wrażliwe na tworzenie wiązań wodorowych do grupy iminowej. W rozpuszczalnikach niepolarnych, np. w cykloheksanie, pasmo emisji tryptofanu jest niemal odbiciem lustrzanym pasma absorpcji przejścia  ${}^1L_b$ . W przypadku rozpuszczalników polarnych, np. etanolu, pasmo emisji wykazuje cechy pasma absorpcyjnego przejścia  ${}^1L_a$ . Powodem tego efektu, jest fakt, że duży wpływ na przejście  ${}^1L_a$  ma polarność rozpuszczalnika, które obniża poziom jego stanu energetycznego. W cykloheksanie, dominuje przejście  ${}^1L_b$ , ponieważ jego stan ma niższą energię w porównaniu z  ${}^1L_a$  [23, 25, 28].

Podobna zależność między emisją Trp a polarnością jego otoczenia ma miejsce w przypadku wodnych roztworów białek. Gdy łańcuch boczny tryptofanu jest zamknięty wewnątrz cząsteczki w tzn. hydrofobowym pudle, utworzonym przez apolarne reszty aminokwasowe, położenie i struktura jego pasma emisyjnego jest zdominowana przez wkład od przejścia  ${}^1L_b$ . Wraz ze wzrostem polarności otoczenia Trp, np. w wyniku ekspozycji na cząsteczki wody lub polarne łańcuchy boczne, pasmo emisji Trp przesuwają się w kierunku dłuższych fal (ang. *red-shift effect*). Należy jednak podkreślić, że w przypadku białek wielo-tryptofanowych obserwowana fluorescencja obrazuje uśrednione warunki otoczenia wszystkich reszt tryptofanowych [23, 26, 29].

Burstein i współpracownicy przedstawili model stanów dyskretnych Trp wraz z pięcioma najbardziej prawdopodobnymi formami spektralnymi [23, 26, 29, 30]:

- Klasa A ( $\lambda_{\max} = 308$  nm) odpowiada fluoroforowi w izolowanym hydrofobowym wnętrzu cząsteczki białka, bez możliwości tworzenia wiązań wodorowych.
- Klasa S ( $\lambda_{\max} = 316$  nm) obejmuje reszty Trp w apolarnym wnętrzu białka, które tworzą eksipleksy w stechiometrii 1:1.
- Klasa I ( $\lambda_{\max} = 330$ – $332$  nm) reprezentuje reszty Trp w apolarnym wnętrzu białka, zdolne do formowania eksipleksów w stechiometrii 2:1.
- Klasa II ( $\lambda_{\max} = 340$ – $342$  nm) obejmują reszty Trp częściowo wyeksponowane w kierunku polarnego rozpuszczalnika lub innych polarnych reszt aminokwasowych.
- Klasa III ( $\lambda_{\max} = 350$ – $353$  nm) zawiera całkowicie wyeksponowane reszty Trp, otoczone przez wysoce mobilne cząsteczki wody generujące efekt relaksacji rozpuszczalnikowej, co skutkuje przesunięciem maksimum emisji w kierunku dłuższych fal.



Intensywność fluorescencji tryptofanu, podobnie jak położenie jego maksimum, jest równie często monitorowane w badaniach nad zmianami strukturalnymi białek wywołanych, np. zmianą pH czy oddziaływaniem z błoną lipidową. Trp ukryty we wnętrzu natywnej cząsteczki białka może znajdować się w kontakcie z resztami aminokwasowymi, które powodują gaszenie statyczne jego fluorescencji [31]. Chen i współpracownicy [32] sklasyfikowali reszty aminokwasowe w dwie grupy według mechanizmu bezpromienistej dezaktywacji stanu wzbudzonego. Najbardziej powszechnym procesem jest przeniesie elektronu w stanie wzbudzonym (ang. *excited-state electron transfer*) katalizowane przez grupy: amidową reszt glutaminowych i asparaginowych, karboksylową reszt kwasów glutaminowego i asparaginowego, tiolową cysteiny i imidazolową histydyny. W tej klasie gaszenie może wystąpić nawet przy odległości powyżej 10 Å. Drugim mechanizmem bezpromienistym dezaktywacji stanu wzbudzonego jest przeniesienie protonu (ang. *excited-state proton transfer*). W ten proces zaangażowane są grupy  $-NH_2$  i  $-OH$  reszt lizyny i tyrozyny, które znajdują się w odległości nie większej niż 8 Å od pierścienia indolowego [33, 34].

Ponadto, gaszenie może następować pomiędzy resztami tryptofanów oddalonych nawet o 16 Å przez wzajemne fluorescencyjne rezonansowe przeniesienie energii oznaczane jako homo FRET (ang. *homo-fluorescence resonance energy transfer*) [23, 31, 5]. Co więcej, osłabienie fluorescencji może następować poprzez oddziaływanie  $NH\cdots\pi$  ilekroć reszty fenyloalaniny lub tyrozyny znajdują się w odległości mniejszej niż 7 Å od łańcucha bocznego tryptofanu [36, 37].

## 2.2. Efekt czerwonego przesunięcia fali wzbudzenia

Efekt czerwonego przesunięcia fal wzbudzenia (ang. *red edge excitation shift*, REES) obserwowany jest głównie w przypadku aromatycznych fluoroforów w polarnych roztworach o dużej lepkości lub w skondensowanych fazach. Polega on na przesunięciu maksimum fluorescencji w kierunku dłuższy fal na skutek wzrostu długości linii wzbudzenia [37, 38], co jest przykładem odstępstwa od reguły Kashy [23, 39]. U podstaw efektu REES leży zmiana oddziaływania fluorofor rozpuszczalnik w podstawowym i wzbudzonym stanie, która wymusza reorientację cząsteczek rozpuszczalnika wokół wzbudzonego fluorofora [23, 37–39].

Tory oraz Merrill [38] wyjaśnili efekt czerwonego przesunięcia na podstawie dwustanowego modelu relaksacji rozpuszczalnikowej. Wzbudzenie układu w maksimum absorpcji powoduje przejście fluoroforu do stanu wzbudzonego F. Jeśli w trakcie jego trwania nie nastąpi reorientacja cząsteczek rozpuszczalnika w otoczeniu fluoroforu, emisja zachodzi ze stanu wzbudzonego F. Natomiast, jeśli dojdzie do reorientacji wówczas energia stanu wzbudzonego F może ulec obniżeniu do stanu wzbudzonego R. Czas tej relaksacji jest zdeterminowany przez naturę oddziaływania fluorofor rozpuszczalnik oraz przez szybkość z jaką to oddziaływanie jest modyfikowane przez moment dipolowy nowego stanu wzbudzenia.

W wyniku wzbudzenia układu do stanu F i R odpowiednio promieniowaniem o długościach fali  $\lambda_1$  i  $\lambda_2$  przy relacji  $\lambda_2 \gg \lambda_1$ , emisja może nastąpić według trzech mechanizmów w zależności od właściwości rozpuszczalnika. W przypadku, gdy fluorofor znajduje się w otoczeniu cząsteczek rozpuszczalnika o niskiej lepkości lub w podwyższonej temperaturze, czas życia stanu wzbudzonego F jest znacznie dłuższy od czasu reorientacji cząsteczek rozpuszczalnika. W tej sytuacji, cząsteczki rozpuszczalnika ulegają przeorganizowaniu zanim nastąpi fluorescencja, a obserwowana emisja nie zależy od długości fali wzbudzenia. W konsekwencji, pasma emisji ze stanu F jak również ze stanu R leżą przy tej samej długości fali  $\lambda_2$ .

W warunkach pośredniej lepkości rozpuszczalnika lub temperatury, czas życia stanu wzbudzonego jest porównywalny z szybkością relaksacji rozpuszczalnika. W tych okolicznościach, wzbudzenie promieniowaniem o wyższej energii prowadzi do fluorescencji zarówno ze stanu F jak i ze stanu R, co skutkuje wyraźnie poszerzonym pasmem z maksimum pomiędzy  $\lambda_1$  a  $\lambda_2$ .

Gdy fluorofor znajduje się w rozpuszczalnikach o dużej lepkości lub w niskich temperaturach, szybkość fizycznej reorientacji dipoli rozpuszczalnika drastycznie maleje i jest znacznie dłuższa od czasu życia stanu wzbudzonego F. W tym przypadku, po wzbudzeniu układu promieniowaniem o długości  $\lambda_1$  nie następuje relaksacja do stanu R i fluorescencja następuje z wyżej energetycznego stanu F. Z tej przyczyny, pasmo emisji przesuwa się w kierunku krótszych fal (ang. *blue-shift*). Natomiast, naświetlenie układu promieniowaniem o niższej energii ( $Ex(R)$ ) powoduje fotoselektywne wzbudzenie tylko tej części populacji fluoroforów, w sąsiedztwie których orientacja dipoli rozpuszczalnika obniża różnicę energetyczną między stanem podstawowym i wzbudzonym. W związku z tym, ich pasma absorpcji i emisji są przesunięte w stronę dłuższych fal i obserwujemy efekt REES.

Śledzenie efektu czerwonego przesunięcia fali wzbudzenia daje możliwość monitorowania lokalnego środowiska i dynamiki fluoroforu [31]. Dostarcza informacji o względnej dynamice relaksacji cząsteczek rozpuszczalnika np. wody, która jest „optycznie cicha” w tej technice pomiarowej. Jest to szczególnie istotne w badaniach nad układami biologicznymi, gdzie hydratacja odgrywa kluczową rolę w wielu procesach biologicznych w tym fałdowaniu białek i ich oddziaływaniu z błoną lipidową [31, 39, 40].

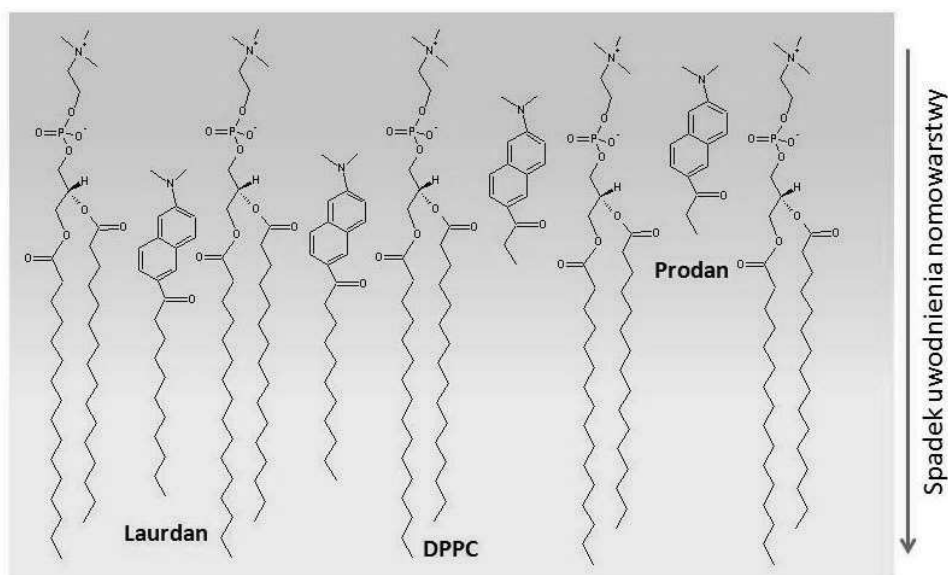
### 2.3. SONDY FLUORESCENCYJNE JAKO MARKERY BŁON LIPIDOWYCH

Lipidy w przeciwieństwie do białek, nie wykazują inherentnej fluorescencji [23]. Dlatego zastosowanie spektroskopii fluorescencyjnej w badaniach błon lipidowych wymaga użycia fluoroforów zewnętrznych [41], które dają możliwość monitorowania mikroskopowej lepkości, polarności, stopnia hydratacji jak również uporządkowania cząsteczkowego, relaksacji rozpuszczalnikowej i potencjału elektrostatycznego miejsca, gdzie znacznik jest ulokowany [42].

Aby fluorofor mógł pełnić rolę sondy fluorescencyjnej, jego emisja powinna cechować się wysoką wydajnością kwantową, która zapewni widmo „dobrej jakości” przy niskim stężeniu sondy. Musi także wykazywać się wysoką „czułością”, co oznacza, że zmiana właściwości spektralnych znacznika koreluje z przemianami zachodzącymi w jego otoczeniu poprzez zmiany intensywności, położenia maksimum fluorescencji czy wartości anizotropii wzbudzenia. Ponadto, ich struktura powinna zapewnić specyficzne rozmieszczenie w danym rejonie błony [42, 43].

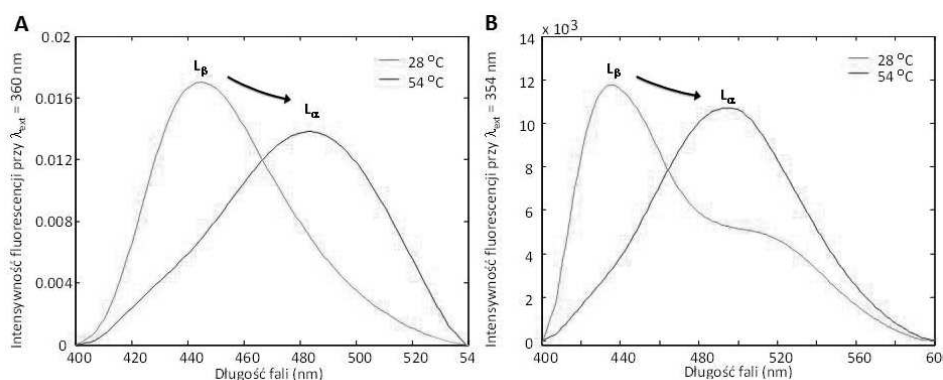
Najbardziej powszechnymi sondami stosowanymi w badaniach błon lipidowych są dwie pochodne naftalenu: Laurdan (6 dodekanoylo 2 dimetyloaminonaftalen) i Prodan (6 propionyl 2 dimetyloaminonaftalen), których fluorescencja jest niezwykle czuła na zmianę polarności otoczenia (Rysunek 8) [44, 45]. Fluoryzującym elementem tych sond jest pierścień naftalenu, który posiada moment dipolowy powstały w wyniku częściowej separacji ładunku pomiędzy grupą 2 dimetyloaminową a 6 karbonylową, zachodzącej m.in. w stanie wzbudzonym w polarnym otoczeniu. Podczas wzbudzenia wzrasta moment dipolowy, który może powodować reorientację dipoli polarnych cząsteczek rozpuszczalnika. Energia wymagana na przeorganizowanie rozpuszczalnika obniża stan wzbudzenia znacznika, co jest widoczne na widmie jako przesunięcie maksimum emisji w kierunku dłuższych fal. Natomiast w przeciwnym przypadku, gdy sonda znajduje się w rozpuszczalniku apolarnym, maksimum fluorescencji jest przy falach krótszych [43–45].

W błonie lipidowej położenie maksimum emisji Laurdanu i Prodanu silnie zależy od stopnia uwodnienia dwuwarstwy, która ulega zmianie, np. podczas głównego przejścia fazowego [45] (Rys. 9). W fazie żelowej, błona lipidowa jest zhydrowana w małym stopniu i relaksacja rozpuszczalnikowa nie zachodzi. Maksimum pasma emisji omawianych sond w dwuwarstwie lipidowej w fazie  $L_{\beta}$  występuje przy ~440 nm. Wzrost temperatury powoduje rozluźnienie dwuwarstwy, co ułatwia penetrację cząsteczek wody w region występowania sondy fluorescencyjnej. Dochodzi wówczas do przekazania energii stanu wzbudzonego na reorientację dipoli wody wokół fluoroforu i pasmo jego emisji ulega przesunięciu w kierunku dłuższych fal [43–45]. Do ilościowej charakterystyki przesunięcia emisji sondy fluorescencyjnej stosowany jest parametr zwany „generalną polaryzacją” [46].



Rysunek 8. Specyficzne rozlokowanie cząsteczek Laurdanu i Prodanu w uwodnionej monowarstwie lipidowej  
 Figure 8. Specific deployment of Laurdanu and Prodanu molecules in a hydrated lipid monolayer

Pomimo opisanych powyżej podobieństw, Laurdan i Prodan różnią się pod względem miejsca rozmieszczenia w błonie lipidowej. Laurdan dzięki dwunastowęgłowemu łańcuchowi alifatycznemu wbudowuje się w apolarne wnętrze dwuwarstwy, a jego grupa fluorozująca znajduje się wówczas na poziomie grup estrowych lipidów. Natomiast, krótki propylowy łańcuch Prodanu uniemożliwia zakotwiczenie sondy w części hydrofobowej, i część cząsteczek Prodanu pozostaje w wodzie. Ich pasmo emisyjne leży w pobliżu 520 nm. Dodatkowo, w porównaniu z Laurdanem, Prodan jest ulokowany bliżej grup fosforanowych lipidów w bardziej polarnym otoczeniu. Dzięki temu jest zdolny do wykrycia subtelniejszych zmian uwodnienia części hydrofilowej błony spowodowanych np. przedprzejściem lub zmianą polarności wywołanej inkorporacją białka w dwuwarstwę lipidową [43, 45].



Rysunek 9. Widma emisyjne Laurdanu (A) i Prodanu (B) wbudowanego w dwuwarstwę liposomów DPPC w fazie żelowej (kolor niebieski) i ciekłokrystalicznej (kolor czerwony)

Figure 9. Emission spectra of Laurdan (A) and Prodan (B) incorporated into a bilayer wall of DPPC liposomes in the gel phase (blue color) and the liquid-crystal phase (red color)

#### 2.4. ANIZOTROPIA FLUORESCENCJI

Anizotropia fluorescencji pozwala śledzić zmiany uporządkowania i sztywności lokalnego otoczenia fluoroforu spowodowanych procesem denaturacji, przejściem fazowym lub asocjacją [23, 47, 48]. W wyniku wzbudzenia światłem spolaryzowanym, w wielu przypadkach emisja jest także spolaryzowana, a jej stopień jest określany przez anizotropię (RFL). Źródłem anizotropii jest wystąpienie absorpcyjnego i emisyjnego momentu przejścia wzdłuż określonych kierunków w strukturze fluoroforu. Pomiar anizotropii opiera się na fotoselektywnym wzbudzeniu fluoroforów wywołanym naświetlaniem spolaryzowaną wiązką. W roztworach jednorodnych fluorofory w stanie podstawowym są losowo zorientowane. Jeśli na taki układ pada światło spolaryzowane, wzbudzone będą preferencyjnie te fluorofory, których wektor momentu przejścia jest równoległy do wektora elektrycznego promieniowania wzbudzającego. Relaksacja promienista może odbywać się poprzez emisję światła spolaryzowanego wzdłuż określonej osi cząsteczki fluoroforu [23].

Pomiar RFL wymaga użycia dwóch polaryzatorów: wzbudzenia i emisji umiejscowionych odpowiednio przed i za próbką. Wartość anizotropii fluorescencji wyznacza się stosując następujący wzór [23, 47, 48]:

$$R = \frac{I_v - I_h}{I_v + 2I_h}$$

gdzie,  $I_{vv}$  to intensywność fluorescencji mierzona z polaryzatorem wzbudzenia i emisji zorientowanymi wertykalnie,  $I_{vh}$  – intensywność fluorescencji zarejestrowana z użyciem polaryzatora wzbudzenia skierowanego wertykalnie, a emisji horyzontalnie.

Najczęściej występującym zjawiskiem, który obniża zmierzoną wartość RFL jest dyfuzja rotacyjna. Polega na zmianie orientacji wektora momentu przejścia emisji podczas trwania stanu wzbudzonego. Rotacja dyfuzyjna jest uwarunkowana sztywnością otoczenia wzbudzonego fluoroforu. Jeśli znajduje się on w środowisku ograniczającym ruchliwość, wówczas emisja jest także spolaryzowana równoległe do kierunku wektora elektrycznego promieniowania padającego. Natomiast, gdy fluorofor ma dużą swobodę rotacji i może przeorientowywać się wielokrotnie podczas stanu wzbudzonego, to kierunek światła emitowanego będzie zrandomizowany, a anizotropia fluorescencji bliska zeru [23]. Zatem, wartość RFL odzwierciedla względne przemieszczenie się fluoroforu w czasie trwania stanu wzbudzonego.

Z powodu przedstawionej zależności między anizotropią fluorescencji a dyfuzją rotacyjną wzbudzonego fluoroforu, spektroskopia fluorescencyjna jest techniką chętnie stosowaną w charakterystyce przemian zachodzących w układach biologicznych. Pomiar widma anizotropii oraz emisji fluorescencji pozwala uzyskać koherentny opis lokalnych zmian w wzbudzonym układzie [48].

#### UWAGI KOŃCOWE

Pomiary widm FTIR-ATR pozwalają na śledzenie zmian strukturalnych zachodzących na trzech poziomach molekularnych błon lipidowych, tj. w rejonie występowania polarnych grup lipidowych, w hydrofobowym wnętrzu błony utworzonej przez apolarne łańcuchy węglowodorowe cząsteczek lipidowych, oraz pomiędzy obszarem hydrofilowym i hydrofobowym reprezentowanym przez lipidowe grupy estrowe. Z kolei, widma fluorescencyjne są źródłem informacji o uwodnieniu, sztywności i upakowaniu cząsteczek budujących systemy błon lipidowych. Badanie struktur drugorzędowych cząsteczek białek i peptydów jest domeną spektroskopii FTIR. W zdobywaniu informacji o agregacji i foldingu białek i peptydów kluczową rolę pełni również spektroskopia fluorescencyjna. Na podstawie analizy wyników z obu metod pomiarowych, uzyskuje się komplementarny i spójny obraz zmian strukturalnych na poziomie molekularnym białka, modelowej błony lipidowej i mieszanych układów białkowo-lipidowych.

#### PODZIĘKOWANIE

Autorzy pracy pragną podziękować Narodowemu Centrum Nauki za wsparcie finansowe otrzymane w ramach dwóch grantów OPUS o numerach 2015/17/B/ST4/03717 i 2012/05/B/ST4/02029.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] H. Fabian, C.P. Schultz, *Fourier transform infrared spectroscopy of peptide and protein analysis* [w:] *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers (Red.), John Wiley & Sons, Inc, 2001.
- [2] L.K. Tamm, S.A. Tatulian, Q. Rev. Biophys., 1997, **30**, 365.
- [3] K.A. Oberg, A.L. Fink, Anal. Biochem., 1998, **256**, 92.
- [4] J.L.R. Arrondo, F.M. Goñi, Chem Phys Lipids, 1998, **96**, 53.
- [5] E. Goormaghtigh, V. Raussens, J.-M. Ruyschaert, Biochim Biophys Acta, 1999, **1422**, 105.
- [6] H.L. Casal, H.H. Mantsch, Biochim. Biophys. Acta, 1984, **779**, 381.
- [7] X. Bin, I. Zawisza, J.D. Goddard, J. Lipkowski, Langmuir, 2005, **21**, 330.
- [8] R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, Biochim. Biophys. Acta, 2013, **1828**, 2347.
- [9] T. Le Bihan, M. Pézolet, Chem. Phys. Lipids, 1998, **94**, 13.
- [10] P. Garidel, A. Blume, W. Hübner, Biochim. Biophys. Acta, 2000, **1466**, 245.
- [11] W. Hübner, H.H. Mantsch, Biophys. J., 1991, **59**, 1261.
- [12] J. Grdadolnik, J. Kidrič, D. Hadži, Chem. Phys. Lipids, 1991, **59**, 57.
- [13] A. Blume, W. Hübner, G. Messner, Biochemistry, 1988, **27**, 8239.
- [14] R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, W. Pohle, H.H. Mantsch, Biophys. J., 1994, **67**, 2367.
- [15] H. Binder, App. Spectrosc. Rev., 2003, **38**, 15.
- [16] H. Binder, A. Anikin, G. Lantzsch, G. Klose, J. Phys. Chem. B, 1999, **103**, 461.
- [17] D.C. Lee, D. Chapman, Bioscience Reports, 1986, **6**, 235.
- [18] J. Grdadolnik, D. Hadži, Chem. Phys. Lipids, 1993, **65**, 121.
- [19] A. Barth, Ch. Zscherp, Q. Rev. Biophys., 2002, **35**, 369.
- [20] A. Barth, Progr. Biophys. Mol. Biol., 2000, **74**, 141.
- [21] H.H.J. de Jongh, E. Goormaghtigh, J.-M. Ruyschaert, Anal. Biochem., 1996, **242**, 95.
- [22] A. Adochitei, G. Drochioiu, Rev. Roum. Chim., 2011, **56**, 783.
- [23] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 2006.
- [24] C.A. Royer, Chem. Rev., 2006, **106**, 1769.
- [25] D.W. Pierce, S.G. Boxer, Biophys. J., 1995, **68**, 1583.
- [26] A.S. Ladokhin, *Fluorescence Spectroscopy in Peptide and Protein Analysis* [w:] *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers (Red.), John Wiley & Sons, Inc, 2006.
- [27] B. Valeur, G. Weber, Photochem. Photobiol., 1977, **25**, 441.
- [28] P.R. Callis, B.K. Burgess, J. Phys. Chem. B, 1997, **101**, 9429.
- [29] C. Shen, R. Menon, D. Das, N. Bansal, N. Nahar, N. Guduru, S. Jaegle, J. Peckham, Y.K. Reshetnyak, Proteins, 2008, **71**, 1744.
- [30] Y.K. Reshetnyak, Y. Koshernik, E.A. Burstein, Biophys. J., 2001, **81**, 1735.
- [31] D.A. Kelkar, A. Chaudhuri, S. Haldar, A. Chattopadhyay, Eur. Biophys. J., 2010, **39**, 1453.
- [32] Y. Chen, M.D. Barkley, Biochemistry, 1998, **37**, 9976.
- [33] A. Chaudhuri, S. Haldar, A. Chattopadhyay, Biochem. Biophys. Res. Comm., 2010, **394**, 1082.
- [34] P.S. Antonini, W. Hillen, N. Ettner, W. Hinrichs, P. Fantucci, S.M. Doglia, J.-A. Bousquet, M. Chabbert, Biophys. J, 1997, **72**, 1800.
- [35] A. Squire, P.J. Verwee, O.Rocks, P. I.H. Bastiaens, J. Struct. Biol., 2004, **147**, 62.
- [36] V. Nanda, L. Brand, Proteins, 2000, **40**, 112.
- [37] S.K. Burley, G.A. Petsko, Science, 1985, **229**, 23.
- [38] M.C. Tory, A.R. Merrill, Biochim. Biophys. Acta, 2002, **1564**, 435.
- [39] H. Raghuraman, D.A. Kelkar, A. Chattopadhyay, *Novel insights into protein structure and dynamics utilizing the red edge excitation shift approach* [w:] *Reviews in Fluorescence*, Ch.D. Geddes, J.R. Lakowicz (Red.), Springer 2005.
- [40] A. Chattopadhyay, Chem. Phys. Lipids, 2003, **122**, 3.

- [41] O. Maier, V. Oberle, D. Hoekstra, *Chem. Phys. Lipids*, 2002, **116**, 3.
- [42] A.P. Demchenko, Y. Mély, G. Duportail, A.S. Klymchenko, *Biophys. J.*, 2009, **96**, 3461.
- [43] K.A. Kozyra, J.R. Heldt, G. Gondek, P. Kwiek, J. Heldt, *Z. Naturforsch.*, 2004, **59a**, 809.
- [44] E.K. Krasnowska, E. Gratton, T. Parasassi, *Biophys. J.*, 1998, **74**, 1984.
- [45] T. Parasassi, E.K. Krasnowska, L. Bagatolli, E. Gratton, *J. Fluor.*, 1998, **8**, 365.
- [46] T. Parasassi, G. De Stasio, A. d'Ubaldo, E. Gratton, *Biophys. J.*, 1990, **57**, 1179.
- [47] F. Yang Jr, M. Zhang, J. Chen, Y. Liang, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1764**, 1389.
- [48] D. Canet, K. Doering, C.M. Dobson, Y. Dupont, *Biophys. J.*, 2001, **80**, 1996.
- [49] L. Stryer, *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.

Praca wpłynęła do Redakcji 7 lutego 2017